(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 4 월 23 일 (23.04.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/057007 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 8/49 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/009772

(22) 국제출원일: 2014 년 10 월 17 일 (17.10.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0124647 2013 년 10 월 18 일 (18.10.2013) KR

(71) 출원인: **부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 609-836 부산시 금정구 부산대학로 63 번길 2 (장전동, 부산대학교), Busan (KR).

(72) 발명자: **정해영 (CHUNG, Hae Young)**; 607-767 부산시 동래구 쇠미로 81 번길 33, 103 동 203 호, Busan (KR). **최재수 (CHOI, Jae Sue)**; 608-749 부산시 남구 오륙도로 85, 109 동 204 호, Busan (KR). **박찬흠 (PARK, Chan Hum)**; 131-802 서울시 중랑구 망우로 72 길 3, Seoul (KR). **정유리 (JUNG, Yu Ri)**; 616-786 부산시 북구 금곡대로 268, 301 동 402 호, Busan (KR).

(74) 대리인: **특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM)**; 153-803 서울시 금천구 가산디지털 1 로 151 이노플렉스 1 차 601 호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

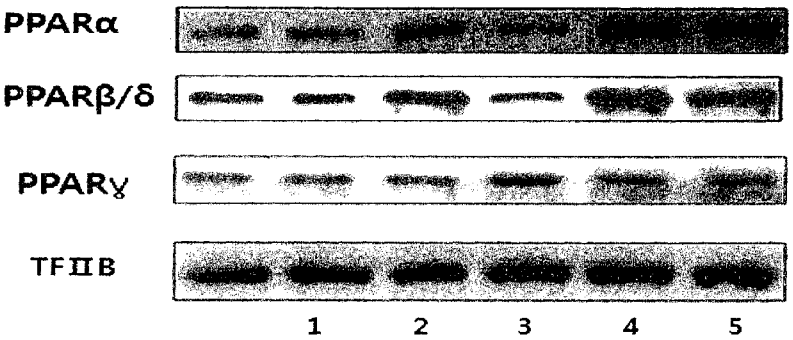
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: COSMETIC COMPOSITION CONTAINING LITHOSPERMATE DERIVATIVE AS ACTIVE INGREDIENT FOR REDUCING OR PREVENTING WRINKLES

(54) **발명의 명칭** : 리소스퍼메이트 유도체를 유효성분으로 함유하는 주름 개선 또는 예방용 화장료조성물

[Fig. 1]



1- Dehydroxy lithospermate 10uM
2- Dimethyl lithospermate 10uM
3- ammonium-potassium lithospermateB 10uM
4- Magnesium lithospermateB 10uM
5- Lithospermate 10uM

(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition containing, as an active ingredient, a lithospermate derivative derived from *Salvia miltiorrhiza* for reducing or preventing wrinkles, and more specifically, to a composition for reducing or preventing wrinkles, wherein the composition contains a natural compound derived from *Salvia miltiorrhiza*, and thus has neither side effects nor toxicity to the human body and reduces or prevents wrinkles through activation of PPARs, promotion of pro-collagen production, and inhibition of MMP activity.

(57) **요약서**: 본 발명은 단삼 유래 리소스퍼메이트 유도체를 유효성분으로 함유하는 주름개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 단삼 유래 천연 화합물을 함유하여 인체에 대한 부작용이나 독성이 없으며 PPARs 의 활성화, 프로-콜라겐 생성 촉진 및 MMP 활성 억제를 통한 피부주름 개선 또는 예방용 화장료조성물에 관한 것이다.

WO 2015/057007 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 리소스퍼메이트 유도체를 유효성분으로 함유하는 주름 개선 또는 예방용 화장료조성물

기술분야

[1] 본 발명은 단삼 유래 리소스퍼메이트 유도체를 유효성분으로 함유하는 주름개선용 화장료조성물에 관한 것이다.

[2] 보다 상세하게는 단삼 유래 천연 화합물을 함유하여 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체(PPAR)을 활성화하고 프로-콜라겐의 생성을 촉진시키며 메트릭스 메탈로프로테나아제(MMP)의 발현을 억제하는 주름 개선 또는 예방에 유용한 화장료조성물에 관한 것이다.

배경기술

[3] 주름이란 피부 진피층의 콜라겐과 탄력섬유의 소실로 인해 피부표면에 생기는 골을 의미하는 것으로 피부 주름 생성과 관련된 주요 기작은 피부가 대기오염, 자외선 노출, 스트레스 또는 질병 등의 유해환경으로부터 산화적 스트레스에 계속적으로 노출됨에 따라 체내의 증가된 라디칼이 진피의 결합조직인 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 히알루론산(hyaluronic acid)들을 파괴하여 피부의 일정부위 침하 현상을 유발시키는 것이다.

[4] 이러한 피부 주름 개선을 위해서 기존에는 아스코르브산, α-토코페롤, 레티놀 및 그 유도체, 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(Super Oxide Dismutase, SOD)등이 피부 주름 개선을 위한 물질로 화장료 또는 의약품에 배합되어 주름 및 기타 피부질환을 방지하기 위하여 이용되었으나, 상기 물질들은 고가의 가격일 뿐만 아니라 화학적 안정성이 좋지 못하여 실질적인 효과를 기대하기 어려운 문제점이 있다.

[5] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 의약품, 식품 및 화장품 분야에서는 보다 안전하면서 피부 주름개선에 효과가 높은 물질을 개발하기 위한 많은 연구를 진행하고 있다.

[6] 단삼 (Salvia miltiorrhiza BUNGE root)은 꿀풀과에 속하는 다년생초본으로써 중국과 한국에서 한약으로 오랫동안 사용되었으므로 안전성이 증명되었으며, 또한, 현재는 식품의 부원료로 사용이 가능하도록 허가되어 있다.

[7] 단삼의 구성성분으로는 디테르페노이드(diterpenoid) 계열의 화합물인 크립토탄시논(Cryptotanshinone), 탄시논 I(tanshinone I), 탄시논 IIA(tanshinone IIA)의 성분으로 구성되어 항암 및 고혈압 억제효과, 페놀성 화합물인 마그네슘 살비아놀레이트(magnesium salvianolate), 마그네슘 리소스퍼메이트(magnesium lithospermate)가 함유되어 심장의 기능을 강화시키며, 그 이외에도 관상 동맥 확장작용, 콜레스테롤 강하 및 항당뇨 작용, 진정작용, 혈압강하, 간 기능 활성화, 항균작용, 항산화 작용, 항염증 작용 등의 약리 작용이 보고되어 있지만,

주름개선효과를 나타내는 성분에 대해서는 규명되어 있지 않다.

[8] 본 발명은 단삼에서 추출한 리소스퍼메이트 유도체를 유효성분으로 함유하는 주름 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것으로 상기 리소스퍼메이트 유도체는 PPARβ/δ 발현 활성을 증가시킴으로써 자연적인 노화, UV에 의한 프로콜라겐 I(pro-collagenI)의 생성 감소 및 MMP 효소의 증가를 억제하는 효과가 뛰어남을 발견하였으며 주름 개선 및 예방을 위한 화장품의 원료로써 사용 가능성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명은 인체에 부작용이 없고 안전성을 갖는 천연물인 단삼 뿌리로부터 추출한 리소스퍼메이트 유도체로 PPARs를 활성화시키고 프로-콜라겐 생성을 촉진시키며 MMP 발현을 억제하여 피부 주름 개선 및 예방효과를 제공하기 위하여, 단삼 유래 PPARs 활성화 물질인 리소스퍼메이트 유도체를 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 및 예방용 화장료조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[10] 마그네슘 리소스퍼메이트B를 유효성분으로 함유하는 주름 개선 또는 예방용 화장료조성물을 제공한다.

[11] 상기 마그네슘 리소스퍼메이트B는 PPARβ 및 PPARδ의 활성을 증가시키고, 프로-콜라겐의 생성을 촉진시키며, 메트릭스 메탈로프로테나아제(MMP)의 발현을 억제시킬 수 있다.

[12] 또한, 상기 마그네슘 리소스퍼메이트B는 단삼(Salviae miltiorrhizae radix)에 에탄올 수용액을 첨가하여 열수 추출하는 단계; 상기 열수 추출한 단삼 추출물을 감압농축하여 건조시키는 단계; 상기 건조한 단삼 건조물에 물을 첨가하여 용해시키는 단계; 상기 용해된 단삼 용해물에 에탄올을 첨가하여 침전물을 제거하는 단계; 상기 침전물이 제거된 상층액을 감압농축하여 활성 분획물을 추출하는 단계; 및 상기 추출한 활성 분획물을 용출용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하는 단계를 포함하여 단삼(Salviae miltiorrhizae radix)으로부터 분리 회수되는 것일 수 있다.

[13] 상기 용출용매는 물, 에탄올 및 60% 아세톤 순으로 컬럼크로마토그래피 정제 단계를 수행하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[14] 본 발명에 따른 조성물은 단삼 유래 리소스퍼메이트 유도체를 사용함으로써, 피부의 PPAR β/δ가 활성화되어 프로-콜라겐 I의 생성을 촉진시키고, MMP 발현의 증가를 억제시킴으로써 피부의 주름을 개선하는 효과를 나타낸다.

[15] 또한 리소스퍼메티트 유도체를 함유하는 조성물은 부작용이 적고 안전하여 화장품 분야에서 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 사람 피부 섬유아세포에서 단삼 유래 리소스퍼메이트 유도체들의 PPARα, PPARβ/δ, PPARγ 활성의 증가를 나타내는 결과이다.

[17] 도 2는 UVB 조사에 의한 사람 섬유아세포에서 단삼 유래 마그네슘 리소스퍼메이트B를 다량 함유한 활성 분획물의 PPARβ/δ 활성 증가를 나타내는 그래프이다.

[18] 도 3은 사람 각질세포에서 단삼 유래 마그네슘 리소스퍼메이트 B의 PPARβ/δ 활성이 증가를 나타내는 그래프이다.

[19] 도 4는 마그네슘 리소스퍼메이트B의 경구 투여에 의해 노화 흰쥐의 피부에서 감소되는 PPARβ/δ 활성의 개선효과에 대한 결과이다.

[20] 도 5는 마그네슘 리소스퍼메이트B가 UVB를 조사한 사람 섬유아세포에서 나타나는 PPARβ/δ 활성 감소를 억제하는 효과를 나타내는 결과이다.

[21] 도 6는 사람 섬유아세포에서 UVB 조사에 의해 감소된 PPARβ/δ 활성의 회복효과를 마그네슘 리소스퍼메이트B와 PPARβ/δ 작용물질인 GW0742를 비교한 결과이다.

[22] 도 7은 마그네슘 리소스퍼메이트B의 경구 투여에 의해 노화 흰쥐 및 UVB 조사 후 사람 섬유아세포에서 감소된 프로-콜라겐I의 생성을 증가시키는 효과를 나타낸 견과이다.

[23] 도 8은 마그네슘 리소스퍼메이트B의 경구 투여에 의해 노화 흰쥐의 피부에서 증가된 MMP12, MMP13의 발현이 억제되는 결과이다.

[24] 도 9는 마그네슘 리소스퍼메이트B가 UVB 조사 후 사람 섬유아세포에서 증가되는 MMP2, MMP9, MMP12 및 MMP13의 발현이 억제되는 결과이다.

[25] 도 10은 본 발명의 추출물 과정을 나타낸 순서도 및 실시예에 따른 추출물의 마그네슘 리소스퍼메이트B의 함량을 측정한 결과이다.

[26] 도 11은 본 발명의 추출물로부터 분획물을 제조하는 과정 및 순수화 과정을 나타낸 순서도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[27] 본 발명은 마그네슘 리소스퍼메이트B를 유효성분으로 함유하는 주름 개선 또는 예방용 화장료조성물을 제공한다.

[28] 상기 마그네슘 리소스퍼메이트B는 PPARβ 및 PPARδ의 활성을 증가시키고, 프로-콜라겐의 생성을 촉진시키며, 메트릭스 메탈로프로테나아제(MMP)의 발현을 억제시킬 수 있다.

[29] 또한, 상기 마그네슘 리소스퍼메이트B는 단삼(Salviae miltiorrhizae radix)에 에탄올 수용액을 첨가하여 열수 추출하는 단계; 상기 열수 추출한 단삼 추출물을 감압농축하여 건조시키는 단계; 상기 건조한 단삼 건조물에 물을 첨가하여 용해시키는 단계; 상기 용해된 단삼 용해물에 에탄올을 첨가하여 침전물을 제거하는 단계; 상기 침전물이 제거된 상층액을 감압농축하여 활성 분획물을

추출하는 단계; 및 상기 추출한 활성 분획물을 용출용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하는 단계를 포함하여 단삼(Salviae miltiorrhizae radix)으로부터 분리 회수되는 것일 수 있다.

[30] 상기 용출용매는 물, 에탄올 및 60% 아세톤 순으로 컬럼크로마토그래피 정제 단계를 수행하는 것일 수 있다.

[31] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 썬 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[32] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[33] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[34] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[35] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[36] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[37]

[38] 하기의 참조예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 참조예를 제공하기 위한 것이다.

[39] **<참고예>**

[40] **1.** 시약

[41] PPARβ/δ, MMP2, MMP3, MMP9, MMP12, MMP13, 프로-콜라겐I형, PPARα, β-액틴는 Santa Cruz Biotechnology 회사로부터 구입을 하였으며 GW0742은 Sigma Chemical 주식회사에서 구입하였다.

[42] 4,5-디아미노플루오레세인 (DAF-2)은 Pure Chemicals 회사로부터 구입하였다. 또한, ECL 웨스턴 블롯팅 감지 시약은 (주)팜텍으로부터 구입하여 사용하였다.

[43] **2.** 실험동물 및 세포

[44] 5개월 및 20개월 스프래그-다우리종(Sprague-Dawley, SD) 흰쥐를 본 연구에 사용하였으며, 사람 섬유아세포와 사람 각질세포는 한국세포은행에서 구입하였다.

[45] **<실시예 1> 리소스퍼메이트 유도체에 의한 PPARs의 활성화 검토**

[46] 1. 리소스퍼메이트 유도체가 사람 섬유아세포에서 PPARα, PPARβ/δ, PPARγ의 활성에 미치는 영향 측정

[47] 본 발명의 리소스퍼메이트 유도체인 디하이드록시 리소스퍼메이트, 디메틸 리소스퍼메이트, 암모늄-포타슘 리소스퍼메이트B, 마그네슘 리소스퍼메이트B의 사람 섬유아세포에서 PPARα, PPARβ/δ, PPARγ 활성화를 확인하기 위하여, PPARα, PPARβ/δ, PPARγ 항체를 이용한 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal Research, 7 , 880-889)을 수행하였다.

[48] 각 리소스퍼메이트 유도체를 SDS-PAGE 에 전기영동한 후 폴리비닐리딘 플로라이드 막에 단백질을 전이시키고 PPARα, PPARβ/δ, PPARγ 항체로 반응시킨 다음 ECL법으로 확인하였다.

[49] 그 결과를 도 1에서 참조하면 마그네슘 리소스퍼메이트B가 PPARα, PPARβ/δ 활성화능이 가장 좋았다.

[50] 2. UVB 조사에 의한 사람 섬유아 세포에서 마그네슘 리소스퍼메이트 B 다량 함유 활성 분획물의 PPARβ/δ 활성에 미치는 영향

[51] 마그네슘 리소스퍼메이트 B 다량 함유한 활성 분획물의 세포내 PPARβ/δ 활성화를 확인하기 위해 사람 섬유아 세포를 사용하여 2ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml의 마그네슘 리소스퍼메이트를B 다량 함유한 활성 분획물을 약물 전처리 2시간 후, UVB 30mJ/cm^{2}를 조사하였다. 2시간 후 세포를 용해시켜 핵 분획을 획득하였으며, PPARβ/δ 항체를 이용해 단백질 양의 확인하는 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal Research, 7 , 880-889)을 실시하였다.

[52] 그 결과 도 2와 같이 대조군에 비해 UVB를 조사하였을 때 PPARβ/δ 활성이 감소하였고, UVB 조사+마그네슘 리소스퍼메이트 B를 다량 함유한 활성 분획물을 처리한 군에서 PPARβ/δ 활성화가 유의성 있는 증가를 나타내었다.

[53] 3. 루시퍼레이즈 분석을 이용한 사람 피부 섬유아세포에서 마그네슘 리소스퍼메이트B의 PPARβ/δ 활성 측정

[54] 마그네슘 리소스퍼메이트B의 세포내 PPARβ/δ 활성화를 확인하기 위해 사람 각질 세포를 사용하였다.

[55] 한 well당 $1x10^5$ 세포를 접종한 후 24시간 배양하고 PPARβ/δ 형질주입(transfection)시켜 5시간 후에 배지를 교체하였다. 배지교체 20시간 후 GW0742 10μM, 마그네슘 리소스퍼메이트B 10μM 약물을 처리하였다.

[56] 약물처리 5시간 후 세포를 용해시키고, 루시퍼레이즈 형광을 이용하여 PPARβ/δ 활성화를 luminescence leader로 측정하였다(Biochemical Pharmacology 84. 2012. 532539).

[57] 그 결과 도 3와 같이 마그네슘 리소스퍼메이트B가 PPARβ/δ 작용물질(agonist)인 GW0742보다 PPARβ/δ 활성이 좋았다.

[58] 4. 마그네슘 리소스페미이트 B를 경구투여한 노화 흰쥐 피부의 PPARβ/δ 활성 확인

[59] 마그네슘 리소스퍼메이트B의 노화 흰쥐의 생체내 PPARβ/δ 활성화를 확인하기 위하여 마그네슘 리소스퍼메이트B를 20일간 2 또는 8mg/kg BW/day를 경구투여 후 피부 조직을 채취해 실험에 사용하였으며 PPARβ/δ 항체를 이용해 단백질 양의 확인을 확인하는 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal Research, 7 , 880-889)을 실시하였다.

[60] 그 결과 도 4를 참조하면 5개월 흰쥐에 비해 20개월 흰쥐 군에서 PPAR0β/δ 활성화가 감소하였고, 마그네슘 리소스퍼메이트B를 경구 투여한 노화 흰쥐군에서 PPARβ/δ 활성화가 유의성 있는 증가 하였다.

[61] 5. UVB 조사에 의한 사람 섬유아 세포에서 PPARβ/δ 활성화 측정

[62] 마그네슘 리소스퍼메이트B의 세포내 PPARβ/δ 활성화를 확인하기 위해 사람 섬유아 세포를 사용하여 2μM 및 10μM의 마그네슘 리소스퍼메이트를B 약물 전처리 2시간 후, UVB 30mJ/cm^2를 조사하였다. 24시간 후 세포를 용해시켜 사이토졸 분획을 획득하였으며, PPARβ/δ 항체를 이용해 단백질 양의 확인하는 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal Research, 7 , 880-889)을 실시하였다.

[63] 그 결과 도 5와 같이 대조군에 비해 UVB를 조사하였을 때 PPARβ/δ 활성이 감소하였고, UVB 조사+마그네슘 리소스퍼메이트B를 처리한 군에서 PPARβ/δ 활성화가 유의성 있는 증가를 나타내었다.

[64] 6. UVB 조사에 의한 사람 섬유아 세포에서 마그네슘 리소스퍼메이트B와 PPARβ/δ agonist인 GW0742의 PPARβ/δ 활성화 측정

[65] 마그네슘 리소스퍼메이트B와 PPARβ/δ 작용물질(agonist)인 GW0742의 세포내 PPARβ/δ 활성화를 확인하기 위해 사람 섬유아세포를 사용하였다.

[66] 10μM PPARβ/δ 작용물질인 GW0742, 2μM 및 10μM의 마그네슘 리소스퍼메이트B를 약물 전처리 2시간 후, UVB 30 mJ/cm^2를 조사하고 24시간 후 세포 용해를 통해 사이토졸 분획을 획득하였으며 PPARβ/δ 항체를 이용해 단백질 양의 확인을 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal

Research, 7 , 880-889)을 실시하였다.

[67] 그 결과 도 6을 참조하면 대조군에 비해 UVB를 조사하였을 때 PPARβ/δ 활성이 감소하였고, UVB 조사+마그네슘 리소스퍼메이트B 처리 군에서는 PPARβ/δ 활성화이 유의있게 증가되었으며, 양성 대조군으로 사용 한 10μM GW0742 (PPARβ/δ agonist) 처리 군 보다 10μM의 마그네슘 리소스퍼메이트 B 처리 군에서 PPARβ/δ 활성이 증가되었다.

[68] **<실시예 2> 마그네슘 리소스퍼메이트B에 의한 프로-콜라겐I형과 MMPs의 변화 측정**

[69] 1. 노화 흰쥐의 피부 및 UVB 조사 후 사람 섬유아 세포에서 마그네슘 리소스퍼메이트B가 프로-콜라겐I형 촉진에 미치는 영향 확인

[70] 마그네슘 리소스퍼메이트B의 노화 흰쥐의 생체내 프로-콜라겐I형 촉진능을 확인하기 위하여 마그네슘 리소스퍼메이트 B를 20일간 2 또는 8mg/kg BW/day를 경구투여 후 피부 조직을 채취한 후 프로-콜라겐I형 항체를 이용해 단백질 양을 확인하는 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal Research, 7 , 880-889)을 실시하였다.

[71] 그 결과 5개월 흰쥐에 비해 20개월 흰쥐 군에서 프로-콜라겐I형 단백질량이 감소하였고, 마그네슘 리소스퍼메이트 B를 경구 투여한 노화 흰쥐군에서 프로-콜라겐I형이 유의성 있는 증가를 나타내었다.

[72] 또 다른 방법으로 마그네슘 리소스퍼메이트 B의 세포내 프로-콜라겐I형을 확인하기 위해 사람 섬유아 세포를 사용하였으며 2μM, 10μM의 마그네슘 리소스퍼메이트 B를 2시간 전처리한 후, UVB 30mJ/cm^{2}를 조사하였으며 24시간 후 세포 용해 시켜 사이토졸 분획을 획득하였으며, 프로-콜라겐I형 항체를 이용해 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal Research, 7 , 880-889)을 실시하였다.

[73] 그 결과 도 7과 같이 대조군에 비해 UVB를 조사하였을 때 프로-콜라겐I형이 감소하였고, 마그네슘 리소스퍼메이트B를 처리하였을 때 프로-콜라겐I형 단백질량이 증가하는 것을 확인하였다.

[74] 2. 마그네슘 리소스퍼메이트B를 경구 투여한 노화 흰쥐의 피부에서 MMPs의 발현량의 변화 측정

[75] 마그네슘 리소스퍼메이트B의 투여가 노화 흰쥐의 피부에서 MMPs의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 마그네슘 리소스퍼메이트 B를 20일간 2 또는 8mg/kg BW/day를 경구투여 후 피부조직을 채취하였다. 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal Research, 7 , 880-889)을 이용하여 피부조직에 있어서의 MMP12와 MMP13 단백질의 발현량을 측정하였다.

[76] 그 결과 도 8과 같이 젊은 쥐와 비교하여, 노화 흰쥐의 피부에서는 MMP12와 MMP13의 발현량이 증가되었으나, 마그네슘 리소스퍼메이트B 투여 군에서는 유의성 있는 감소를 보였다.

[77] 3. 마그네슘 리소스퍼메이트B가 UVB 조사 후 사람 섬유아 세포에서 MMPs의

발현에 미치는 영향을 측정

[78] 마그네슘 리소스퍼메이트B가 세포내 MMPs의 발현량에 미치는 영향을 확인하기 위해 사람 섬유아 세포에 2μM, 10μM 마그네슘 리소스퍼메이트 B를 처리하고 2시간 후, UVB 30mJ/cm^{2}를 조사하였다. 24시간 후 세포 용해를 통해 사이토졸 분획을 획득하였으며, MMP2, MMP9, MMP12, MMP13의 발현량을 웨스턴 블랏(Western blot) 분석법(Archives of Pharmacal Research, 7 , 880-889)으로 확인하였다.

[79] 그 결과 도 9과 같이 정상 대조군에 비해 UVB를 조사하였을 때 MMP2, MMP9, MMP12, MMP13의 발현이 증가하였고, 마그네슘 리소스퍼메이트 B를 처리하였을 때 MMP2, MMP9, MMP12, MMP13의 단백질 발현량이 감소함으로써 마그네슘 리소스퍼메이트 B에 의해 MMPs가 억제되는 것을 확인하였다.

[80] **<실시예 3> 단삼 유래 마그네슘 리소스퍼메이트 B 추출**

[81] 1. 단삼 유래 마그네슘 리소스퍼메이트 B 추출법에 따른 농도 비교

[82] 단삼으로부터 마그네슘 리소스퍼메이트 B를 추출하기 위한 최적화 방법을 위하여 하기 추출과정을 수행하였으며 이를 통해 추출된 마그네슘 리소스퍼메이트 B의 농도를 비교하였다.

[83] 1-1. 100% 에탄올 추출법

[84] 도 10(1)과 같은 방법으로 음건 세절된 단삼 200g을 100% 에탄올 400ml에 넣어 충분히 팽윤시킨 다음, 3시간 동안 추출기로 2번 반복 추출한 후, 여과하여 얻은 추출액을 저온 감압 농축하여 단삼 열수 추출물 20 g (10.0%, 이하 'E-S'이라 명명함)을 얻었다.

[85] 1-2. 50% 에탄올 추출법

[86] 도 10(2)와 같은 방법으로 음건 세절된 단삼 200g을 50% 에탄올 400ml에 넣어 충분히 팽윤시킨 다음, 3시간 동안 추출기로 2번 반복 추출한 후, 여과하여 얻은 추출액을 저온 감압 농축하여 단삼 열수 추출물 37.9 g (19.0%, 이하 '50E-S'이라 명명함)을 얻었다.

[87] 1-3. 마그네슘 리소스퍼메이트B의 농도 측정

[88] 상기 100% 에탄올과 50% 에탄올에 의해 추출된 마그네슘 리소스퍼메이트 B의 농도를 측정하여 가장 적합한 추출방법을 확인하였다.

[89] 상기 추출물들을 메틸렌클로라이드-메탄올-물 혼합용매 (5:1:1, 25:8:5, 7:3:1, 65:35:10)를 사용하여 TLC 전개를 실시하여 각각의 추출물에 함유되어있는 마그네슘리소스퍼메이트B의 함량을 관찰하였다.

[90] 그 결과 도 10(3)를 참조하면 50% 에탄올에 의해 추출된 마그네슘 리소스퍼메이트 B가 100% 에탄올에 의해 추출된 마그네슘 리소스퍼메이트 B 보다 높은 농도를 보였다.

[91] 2. 50% 에탄올 추출법에 의한 활성 분획물 분획과정 및 정제과정

[92] 도 11과 같이 상기의 50% 에탄올(EtOH) 추출법에 의해 추출된 50E-S에 동량의

물을 첨가하여 용해한 후, 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 유도된 결정을 제거하고 마그네슘 리소스퍼메이트B가 다량 함유된 분획물(EtOH 함유 층)을 획득하였다.

[93] 상기 감압 농축된 50% 에탄올 열수 추출물에 동량의 물을 첨가하여 용해시킨 후 그 부피의 2배에 해당되는 4 ℃ 이하의 냉 에탄올을 첨가하여 혼합했다.

[94] 다음으로, 상기 에탄올 혼합물을 4 ℃ 이하의 온도에서 4시간 동안 방치하여 추출을 진행한 후 상기 추출 과정에서 생성된 침전물은 제거하고 상층액을 얻었다.

[95] 상기 추출 과정에서 침전물을 제외한 상층액에는 마그네슘리소스퍼메이트B 성분이 다량 함유되어 있다. 따라서, 본 발명에서는 단삼 50% 에탄올 열수 추출물을 냉 에탄올과 혼합하여 침전되는 침전물을 버리고 상층액을 취함으로써, 열수 추출물 중에서 마그네슘리소스퍼메이트B 성분의 수율을 15.765 % 로 크게 향상시켰다.

[96] 마지막으로, 상기 열수 추출물의 순도를 높이기 위하여 용출용매(물-메탄올-60% acetone)의 순으로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하고 정제된 마그네슘 리소스퍼메이트B (S3)를 획득하였다.

[97]

[98] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

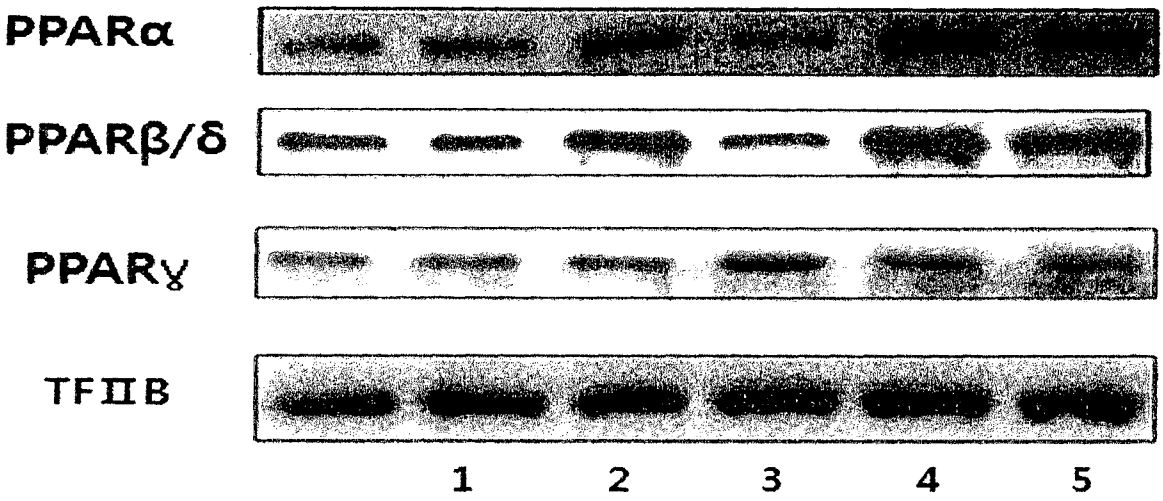
[청구항 1] 마그네슘 리소스퍼메이트B를 유효성분으로 함유하는 주름 개선 또는 예방용 화장료조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 마그네슘 리소스퍼메이트B는 PPARβ 및 PPARδ의 활성을 증가시키고, 프로-콜라겐의 생성을 촉진시키며, 메트릭스 메탈로프로테나아제(MMP)의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 주름 개선 또는 예방용 화장료조성물.

[청구항 3] 청구항 1항에 있어서, 상기 마그네슘 리소스퍼메이트B는 단삼(Salviae miltiorrhizae radix)에 에탄올 수용액을 첨가하여 열수 추출하는 단계; 상기 열수 추출한 단삼 추출물을 감압농축하여 건조시키는 단계; 상기 건조한 단삼 건조물에 물을 첨가하여 용해시키는 단계; 상기 용해된 단삼 용해물에 에탄올을 첨가하여 침전물을 제거하는 단계; 상기 침전물이 제거된 상층액을 감압농축하여 활성 분획물을 추출하는 단계; 및 상기 추출한 활성 분획물을 용출용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하는 단계를 포함하여 단삼(Salviae miltiorrhizae radix)으로부터 분리 회수되는 것을 특징으로 하는 주름 개선 또는 예방용 화장료조성물.

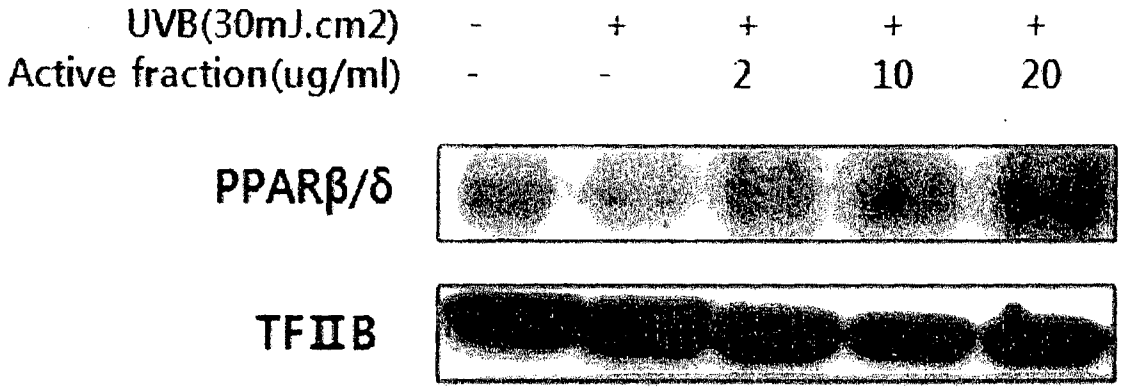
[청구항 4] 청구항 3항에 있어서, 상기 용출용매는 물, 에탄올 및 60% 아세톤 순으로 컬럼크로마토그래피 정제 단계를 수행하는 것을 특징으로 하는 주름 개선 또는 예방용 화장료조성물.

[Fig. 1]

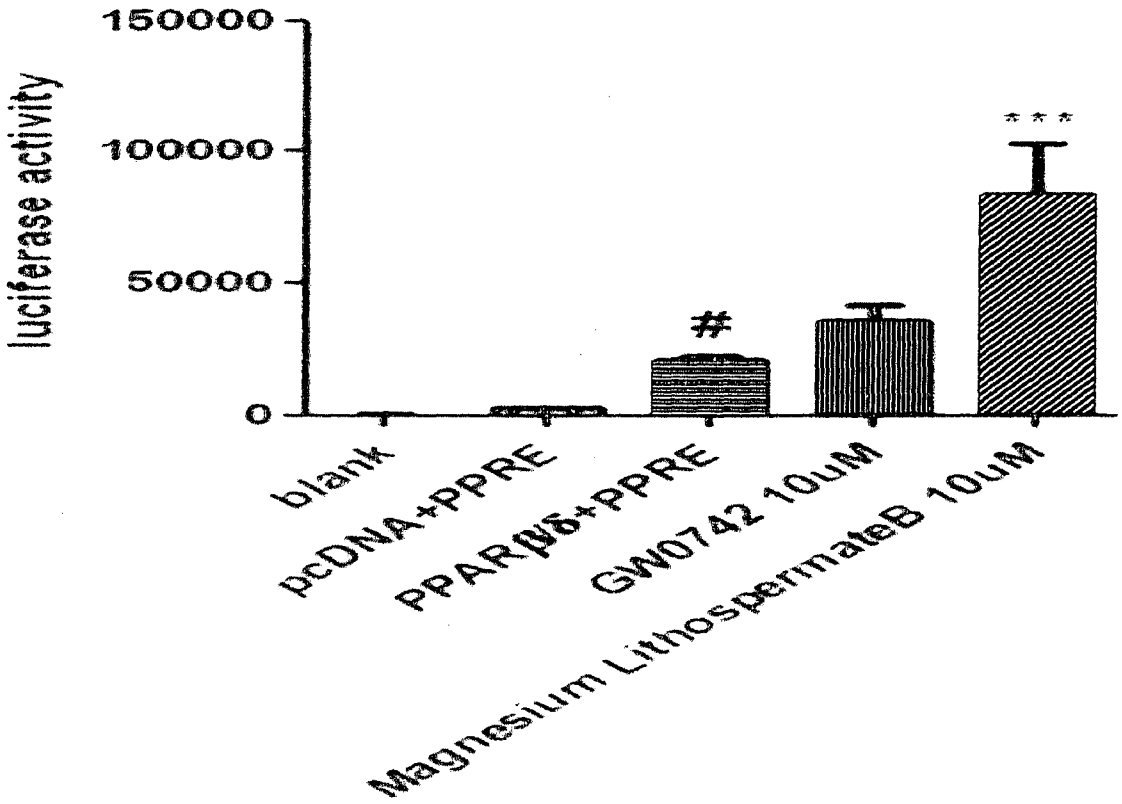


1- Dehydroxy lithospermate 10uM
2- Dimethyl lithospermate 10uM
3- ammonium-potassium lithospermateB 10uM
4- Magnesium lithospermateB 10uM
5- Lithospermate 10uM

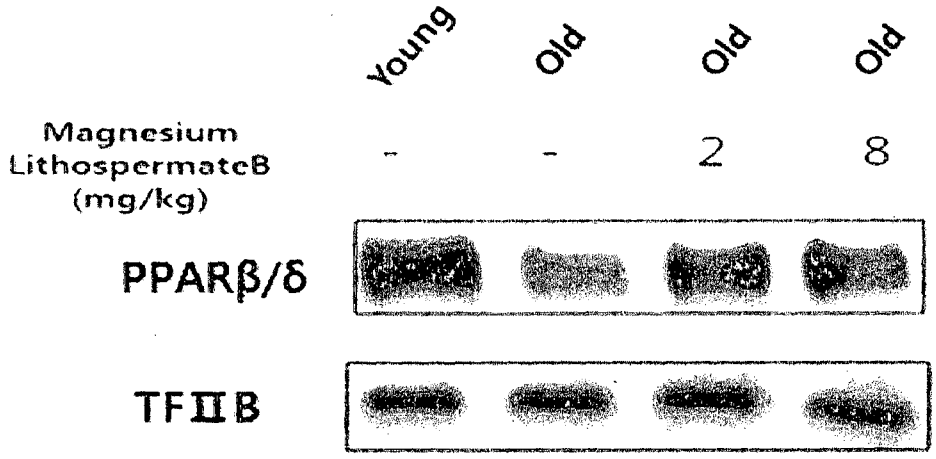
[Fig. 2]



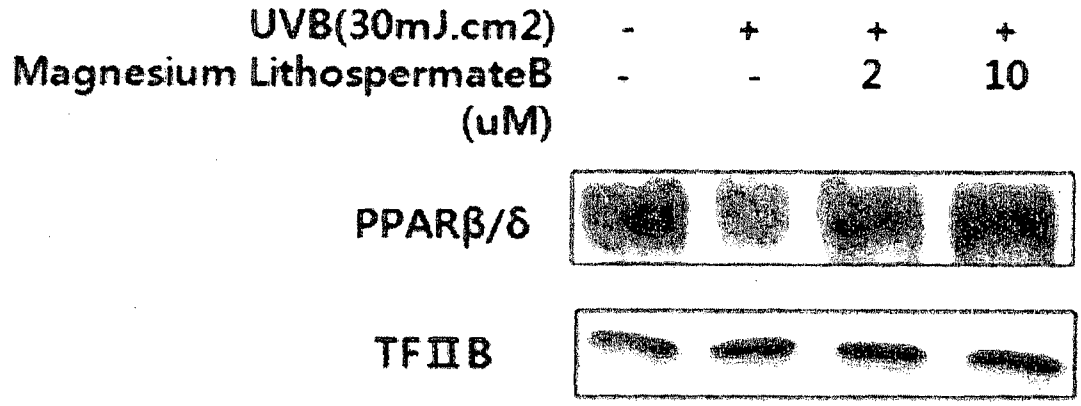
[Fig. 3]


150000
100000
50000
0
luciferase activity
#
* * *
blank
pcDNA+PPRE
PPARβ/δ+PPRE
GW0742 10uM
Magnesium LithospermateB 10uM

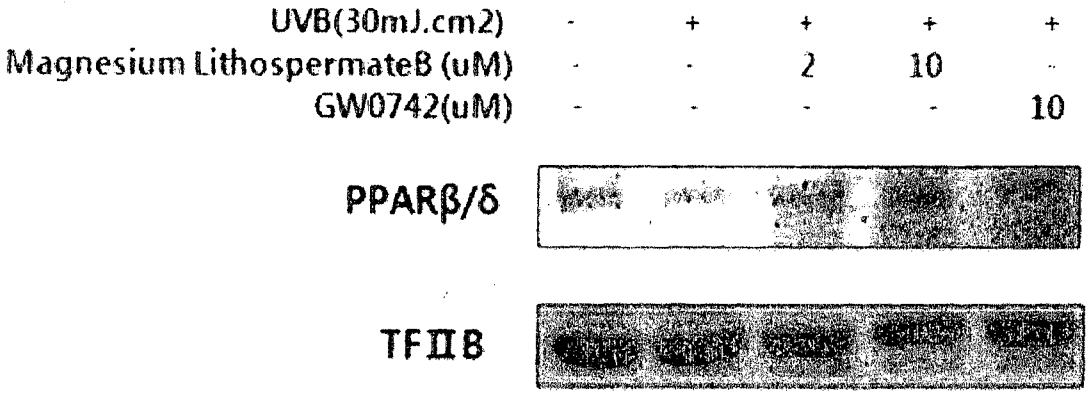
[Fig. 4]


Young
Old
Old
Old
Magnesium LithospermateB (mg/kg)
-
-
2
8
PPARβ/δ
TFIIB

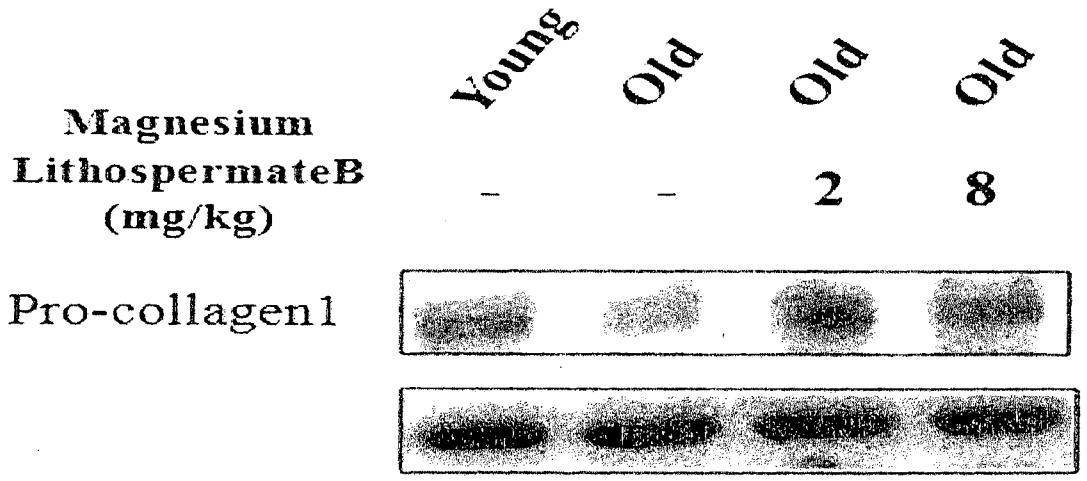
[Fig. 5]



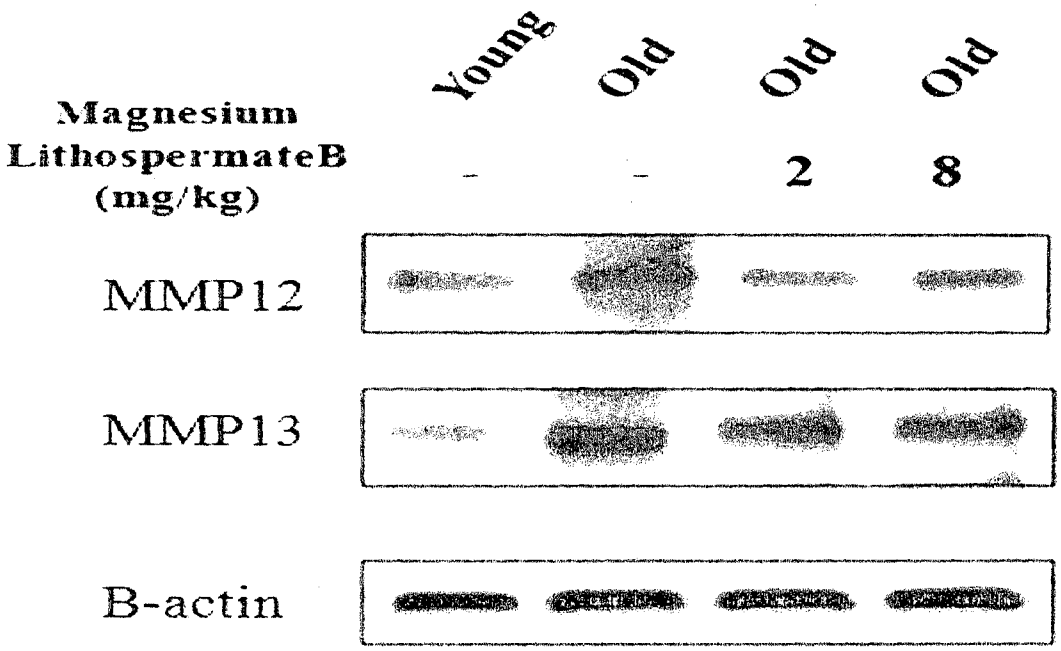
[Fig. 6]



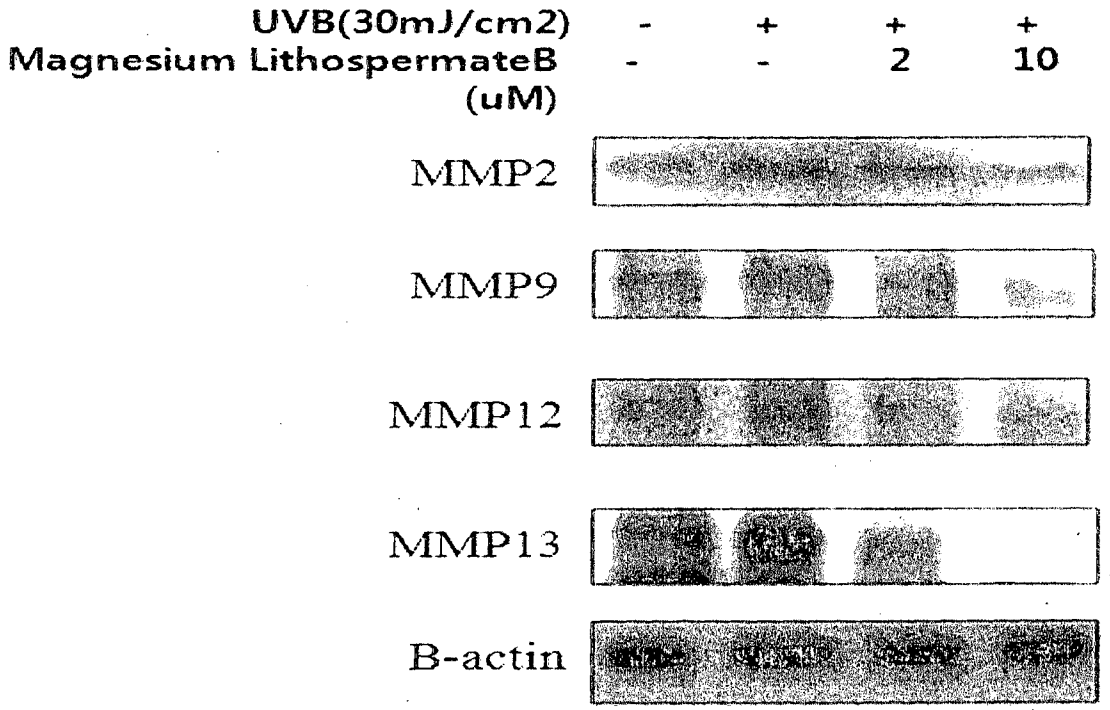
[Fig. 7]



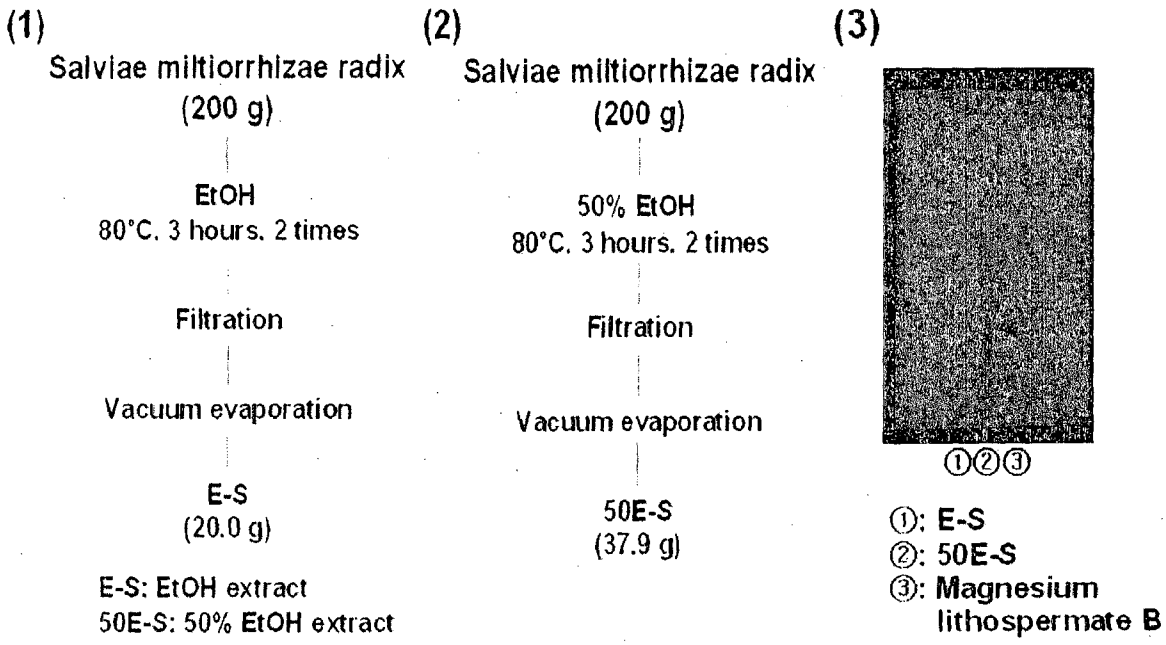
[Fig. 8]


Young
Old
Old
Old
Magnesium LithospermateB (mg/kg)
-
-
2
8
MMP12
MMP13
B-actin

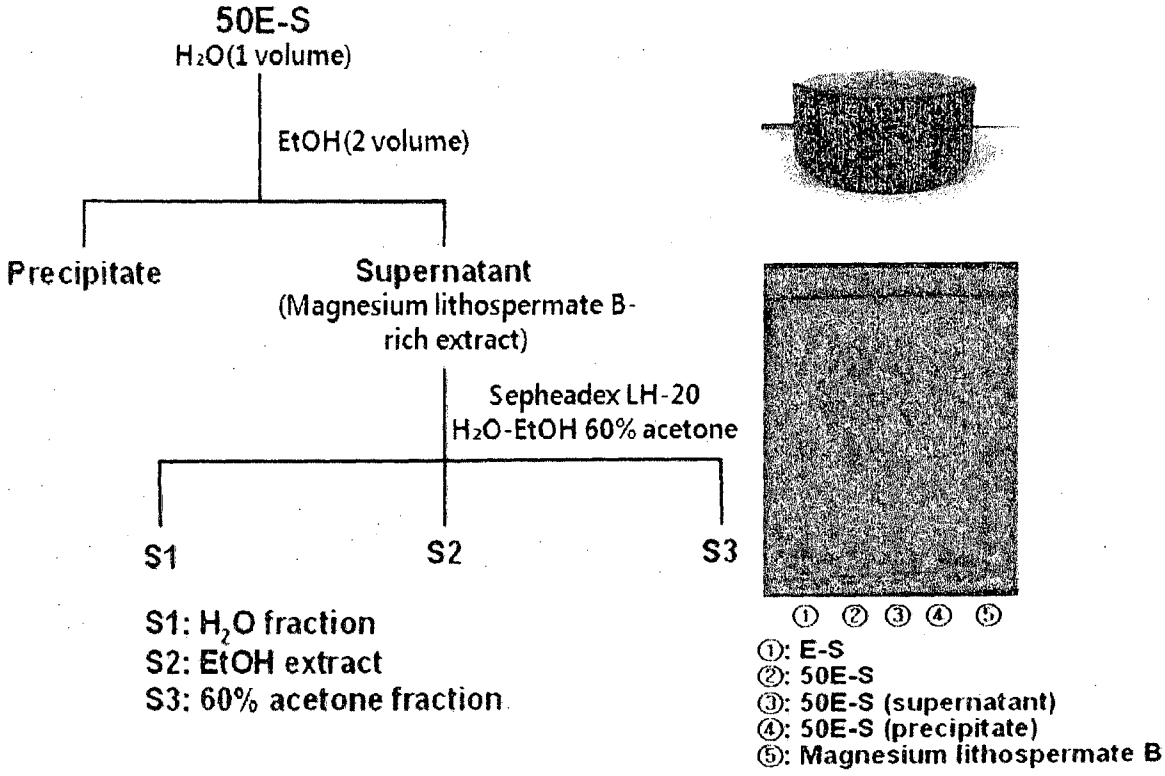
[Fig. 9]


UVB(30mJ/cm2)
-
+
+
+
Magnesium LithospermateB (uM)
-
-
2
10
MMP2
MMP9
MMP12
MMP13
B-actin

[Fig. 10]


(1)
Salviae miltiorrhizae radix
(200 g)
EtOH
80°C. 3 hours. 2 times
Filtration
Vacuum evaporation
E-S
(20.0 g)
E-S: EtOH extract
50E-S: 50% EtOH extract
(2)
Salviae miltiorrhizae radix
(200 g)
50% EtOH
80°C. 3 hours. 2 times
Filtration
Vacuum evaporation
50E-S
(37.9 g)
(3)
①②③
①: E-S
②: 50E-S
③: Magnesium lithospermate B

[Fig. 11]


50E-S
H2O(1 volume)
EtOH(2 volume)
Precipitate
Supernatant
(Magnesium lithospermate B-rich extract)
Sepheadex LH-20
H2O-EtOH 60% acetone
S1
S2
S3
S1: H2O fraction
S2: EtOH extract
S3: 60% acetone fraction
① ② ③ ④ ⑤
①: E-S
②: 50E-S
③: 50E-S (supernatant)
④: 50E-S (precipitate)
⑤: Magnesium lithospermate B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/009772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 8/49(2006.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 8/49; A61Q 19/08; A61P 39/00; A61K 8/97; A61K 31/343; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: magnesium lithospermate B, cosmetic, antioxidant, PPAR, lithospermicacid, aging, antiwrinkle, wrinkles, antioxidant, cosmetics

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Studies on the biochemical and molecular biological mechanisms of antioxidant and anti-aging action and active site of Salvia miltiorrhiza(KOSEF 951-0708-061 -2), Korea Foundation for the Advancement of Science and Creativity, 24 April 1997 See pages 3, 9, 14, 31-34.	1-4
Y	PARK, Soo Nam, Effect of Natural Products on Skin Cells -Action and Suppression of Reactive Oxygen Species-, Journal of the society of cosmetic scientists of Korea, vol. 25 no. 2, 30 June 1999 See pages 77-88, 103-106.	1-4
A	KR 10-2004-0108081 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 23 December 2004 See abstract; pages 3-6.	1-4
A	KR 10-2004-0100080 A (NADRI COSMETICS CO., LTD.) 02 December 2004 See abstract; pages 3-5.	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 JANUARY 2015 (29.01.2015)	**29 JANUARY 2015 (29.01.2015)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

International application No.
PCT/KR2014/009772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2004-0108081 A	23/12/2004	NONE	
KR 10-2004-0100080 A	02/12/2004	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/009772

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 8/49(2006.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 8/49; A61Q 19/08; A61P 39/00; A61K 8/97; A61K 31/343; A61Q 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: magnesium lithospermate B, cosmetic, antioxidant, PPAR, lithospermic acid, aging, antiwrinkle, 주름, 항산화, 화장품

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	단삼으로부터 분리된 Magnesium Lithospermate B 및 그 유도체들의 항산화·항노화작용의 생화학·분자생물학적 기전 및 활성부위에 관한 연구(KOSEF 951-0708-061-2), 한국과학재단, 1997년4월24일 페이지 3,9,14,31-34 참조.	1-4
Y	박수남, 천연물의 피부세포에 미치는 영향 -활성산소의 작용과 억제-, 대한화장품학회지, 제25권2호, 1999년6월30일 페이지 77-88, 103-106 참조.	1-4
A	KR 10-2004-0108081 A (부산대학교 산학협력단) 2004.12.23 요약; 페이지 3-6 참조.	1-4
A	KR 10-2004-0100080 A (나드리화장품주식회사) 2004.12.02 요약; 페이지 3-5 참조.	1-4

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2015년 01월 29일 (29.01.2015)	2015년 01월 29일 (29.01.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관
염금희
전화번호 +82-42-481-8732

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/009772

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2004-0108081 A	2004/12/23	없음	
KR 10-2004-0100080 A	2004/12/02	없음	